

ケーススタディ：SurePrint オリゴヌクレオチドライブラリ

ワシントン大学の David Baker Lab、タンパク質設計の 新たな方法を開発

タンパク質機能解析の新しい方法

科学研究は自然に対する私たちの基本的な理解を変え、基本原理を新たなコンテキストにあてはめるのを助けます。リサーチサイエンティストの Brian Coventry 博士は、複雑なタンパク質のモデリングの課題に着手するため、ワシントン大学の David Baker Lab に参加しました。Coventry 博士のチームは、標的とするタンパク質の 3 次元構造の情報のみで、その標的の特異的な部位に高い親和性で結合できる小さなタンパク質を設計する方法を開発しました。

Coventry 博士にとって、これは生物物理学上の興味深い謎でした。コンピュータプログラミングを得意とする化学エンジニアでもあった Coventry 博士は、タンパク質相互作用の予測に応用できる、物理的な知見を発見することに関心がありました。博士は Baker Lab の一員として、タンパク質間相互作用領域の設計に関する課題解決に貢献しました。彼らのアプローチは、グラフィティングや他の従来の手法とは異なり、結晶構造やタンパク質スキャフォールドではなく、タンパク質の結合様式に基づいています。

Coventry 博士のチームは、ミニバインダータンパク質を設計するための、ユニークな計算論的アプローチを開発しました。このモデルでは、まず可能性のある結合様式を広く探索し、最も有望な領域が特定されると、その領域のタンパク質相互作用に焦点を当てるという、2 段階のメソッドを用いています。¹ 彼らは、A 型インフルエンザウイルスの 1 型ヘマグルチニン (HA) 群や 2 型 HA 群を含む 12 の標的部位に対するミニバインダータンパク質を設計・開発し、このパイプラインの成功を示しました。¹ 彼らの方法は、最近、Nature 誌の Accelerated Article Preview として発表されました。¹

このパイプラインは、他の類似のプロジェクトよりも多くのデータを得ることができるため、タンパク質がどのように相互作用し、機能するかをより深く知ることができます。このミニバインダータンパク質は、医薬品、診断薬、分子マシンなど、さまざまな生物学的用途に適用でき、例えば、ウイルス検出や、ウイルスの増殖を抑制する治療用タンパク質として使用することが可能です。



Brian Coventry, Ph.D.
リサーチサイエンティスト
David Baker Lab
ワシントン大学

挑戦から成功へ

プロジェクト開始当初は、設計-試験-学習ワークフローに必要なデータがありませんでした。研究チームははじめにいくつかの実験を試みましたが、どれもうまくいきませんでした。そこで、人力による解析と直感に基づいて有望と思われるタンパク質を特定するという、異なるアプローチをとりました。そして 10,000 のタンパク質を解析し、手動でそれらを絞り込んだ末に、設計-試験-学習サイクルを開始するために必要なデータを得ることができました。

その後、チームは大きな疎水性パッチのあるタンパク質など、狙いやすい標的に対してバインダーを作成しました。しかし、標的タンパク質はそれぞれ異なるため、それぞれに応じた戦略が必要でした。「標的タンパク質ごとに独自の難題がありました」と、Coventry 博士は語っています。各標的の疎水性ポケット、水素結合、アルギニンの位置、フェニルアラニンの位置、カチオン- π 相互作用を分析する必要がありました。

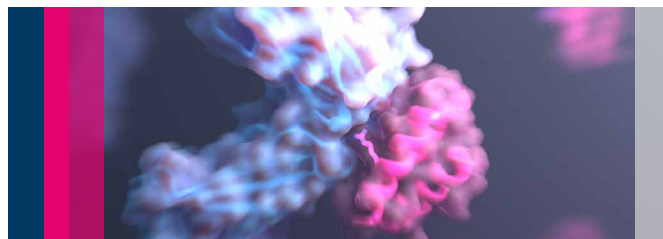
論文で示されているように、Coventry 博士とチームはこのパイプラインを使用して、A 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン HA2 領域に対するミニバインダーを作成することに成功しました。Coventry 博士とともに研究に取り組む Longxing Cao 博士は、長い時間を費やし、グリシンと結合部位との溝に適合するヘリックスを設計し、最終的に、その溝に完全に適合する 10 残基のヘリックスを作成しました。

チームは Agilent SurePrint オリゴヌクレオチドライブラリを用いて、大腸菌で発現させたタンパク質をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、バイオレイヤー干渉法により親和性を判断しました。ミニバインダーは意図したとおりに機能し、チームは正しい結合部位を把握できただけでなく、HA2 の結晶構造を作成することにも成功しました。

ミニバインダーの利点とアプリケーション

結晶構造が重要である一方で、タンパク質相互作用は多くの有益な情報をもたらします。また、ミニバインダーの手法により、タンパク質の側鎖の働きについて、より詳しく理解することができます。「これは、活性部位の設計や、タンパク質の可溶性を高めるために重要です。タンパク質の物理的性質と凝集について、これまで以上に理解が進んでいます。例えば、溶出する前に、タンパク質の疎水性の程度を把握することができます」と Coventry 博士は説明しました。

これらのミニバインダータンパク質は人工物であるため、安定性を念頭に設計することが可能です。抗体や抗体ベースの治療用タンパク質は冷蔵または冷凍保存する必要がありますが、ミニバインダーは室温でも安定しています。そのため、流通時の低温保管を必要とせず、温暖な地域や国に発送するのに適しています。ミニバインダーの治療用アプリケーションには、インフルエンザや SARS-CoV-2 などウイルスの拡散をくい止めることも含まれ、その場合に遠隔地の人々まで広く届けられることがミニバインダーの利点となります。



ミニバインダーは、ウイルス検出など、他の複数のアプリケーションにも使用でき、現在のメソッドよりも優れた性能を示す可能性があります。ターゲット細胞表面の受容体は、ミニバインダーにとって最適な候補となります。ミニバインダーは細胞表面の受容体と結合することで、がん細胞の検出、がん細胞を標的とした薬物の送達、受容体の活性化または不活性化、タンパク質の標識などの用途に使用できます。

オリゴヌクレオチドからタンパク質へ

Baker Lab のパイプラインでは、標的タンパク質固有のミニバインダーのペプチド配列の設計に、SurePrint 230 塩基対 (bp) オリゴヌクレオチドライブラリを中心として使用しています。ライブラリはまた、最適なデザインを特定するためのハイスループットの実証的スクリーニングにも使用されます。設計が向上し続けるのに伴い、実証試験は今後も必要となります。「アジレントはリアルワールドへの入口です。私たちの作業はすべてコンピュータ上で行われるため、アジレントから DNA が提供されるまで、現実ではありません」と Coventry 博士は話しています。

チームはこのパイプラインを使用して、数百万のタンパク質を設計し、合成了しました。「200 万以上のタンパク質に対し十分な DNA 配列をアジレントに注文しました。それらは思っていたよりもはるかに安価で、桁違いのコスト削減になります」値ごろ感も大切なものの、オリゴライブラリが時間どおりに提供されることが最も重要であると博士は指摘し、次のように話しています。「私たちのインフラストラクチャは約 230 塩基対をベースとしているため、ライブラリが届くかどうかという疑問があれば、このようなことはできませんから、これは非常に重要なことです。アジレントに注文すれば、230 塩基対のオリゴが間違いなく届きます」

現在では、この簡単に実行できるパイプラインを、論文からステップバイステップでたどることができます。ユーザーは、結合する位置を判断するためにタンパク質を十分に理解しなければならず、Linux を使用してソフトウェアをコンパイルする必要があります。しかし、それ以降については、ツールはほぼ完全に自動化されており、疎水性に従ってタンパク質が色付けもされます。最後に、オリゴヌクレオチドライブラリで注文する必要がある DNA のテキストファイルが生成されます。

次のステップと今後の展望

研究チームは、今後、注文する遺伝子が減っていくことを望んでいます。これが、ワークフロー成功率の向上の指標となるからです。ターゲットタンパク質の難度はさまざまです。ターゲットが容易であるほど、成功率は向上し、ターゲットが困難であるほど、成功率は低くなります。「多くの天然のタンパク質は非常に複雑であるため、現在の成功率は基本的にゼロです。成功率が上がるにつれ、より幅広いタンパク質を標的とすることができ、私たちのパイプラインは向上し続けるでしょう」と Coventry 博士は語りました。パイプライン成功率の向上によって、発見のプロセスも加速されていくでしょう。

Coventry 博士は「ディープラーニングは成功率を向上させ、パイプラインを作成するためのパイプラインの実力に大きな違いをもたらしました。さらにディープラーニングとの連携が進んでいくでしょう」と話します。チームは 50 % の成功率を目指しています。今後、非常に高い成功率を達成できれば、プロセスのさらなる自動化が可能となります。

より完全に自動化された繰り返し処理には、ユーザーが標的タンパク質配列と構造をアップロードするユーザーインターフェースなどがあります。パイプラインでは、可能性のあるパイプラインのすべての位置を示したマップが生成されます。次にユーザーが最良の位置を選択し、パイプラインでタンパク質配列とパイプラインの予測親和性が提示されます。

結論

SurePrint オリゴヌクレオチドライブラリを活用しているワシントン大学 David Baker Lab の Coventry 博士の研究チームは、将来の研究者たちのために、分散コンピューティングによりタンパク質設計を容易化する取り組みの最前線に立っています。チームは、タンパク質間の相互作用を予測する生物物理学的性質を発見しました。再現しやすい方法でメソッドを公開することにチームが前向きであるおかげで、彼らのユニークなパイプラインにより、他の研究者たちがさらに幅広くこの分野に参入できるようになりつつあります。そして同様に、これらの研究者たちが高度なタンパク質モデリング手法を使用して、より優れた診断、治療用タンパク質、タンパク質ベースのその他のアプリケーションを効率的に設計できるようになっているのです。

参考文献

1. Cao, L.; Coventry, B.; Goreshnik, I.; Huang, B.; Sheffler, W.; Park, J. S.; Jude, K. M.; Marković, I.; Kadam, R. U.; Verschueren, K. H. G.; Verstraete, K.; Walsh, S. T. R.; Bennett, N.; Phal, A.; Yang, A.; Kozodoy, L.; DeWitt, M.; Picton, L.; Miller, L.; Strauch, E.-M.; DeBouver, N. D.; Pires, A.; Bera, A. K.; Halabiya, S.; Hammerson, B.; Yang, W.; Bernard, S.; Stewart, L.; Wilson, I. A.; Ruohola-Baker, H.; Schlessinger, J.; Lee, S.; Savvides, S. N.; Garcia, K. C.; Baker, D. Design of Protein-Binding Proteins from the Target Structure Alone. *Nature* **2022**, 605 (7910), 551–560. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04654-9>.



[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

G230525

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2022

本書の一部または全部を画面による事前の許可なしに複製、
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、
法律で禁止されています。

Printed in Japan, July 1, 2022

5994-5067JAJP